

N-Acetyl-D-glucosamineの哺乳動物に よる栄養的利用に関する研究 (予報)

村田 希久・北川 忠男

Studies on Nutritional Utilization of N-Acetyl-D-glucosamine by Mammalia.

MURATA KIKU and TADAO KITAGAWA

緒 言

N-Acetyl-D-glucosamineは chitin の成分として、広く下等動物界、カニ、エビ、昆虫、プランクトンなどの外骨格)に分布しており、その構造は、高等植物の骨格成分である cellulose におけるD-glucoseの β -1,4結合による直線的ポリマーのそれに類似する。人には celluloseを消化する酵素がないようにchitinも消化困難であり、現在のところchitinを水解する酵素はカタツムリ、或種の菌に存在することが知られているだけで、斯方面の研究はあまり進んでいない。

しかしchitinを塩酸水解することによってえられるD-glucosamine-HClをN-acetyl化すれば、化学的に大量のN-acetyl-D-glucosamineが製造可能である。このアミノ糖は水に易溶であり、融点205℃、施光度 $[\alpha]_D^{20} + 41$ (α 型, β 型平衡値)である。

一方N-acetyl-D-glucosamineは、高等動物のムコ多糖類や、糖タンパク質の成分として、また乳汁中のオリゴ糖の成分としても存在する。これら体成分として必要とされるN-acetylglucosamineの適量がglucoseから*de novo*に合成されうであろうが、また一面食餌に由来するglucosamineもしくはacetylglucosamineも一部利用される可能性もあるという報告がある。¹⁾ 此観点から1966年 Capps¹⁾は、白ネズミにD-[1-¹⁴C]-glucosamine, N-acetyl-D-[1-¹⁴C]glucosamine, もしくはN-[1-¹⁴C]acetyl-D-glucosamineを経口的に投与し、それらの吸収や代謝について研究した。また1929年有山ら²⁾が29種におよぶ各種の糖の栄養実験を白ネズミによっておこない、それらの栄養価の比較をおこなった際に、その1つとしてglucosamineについて実験しているにすぎない。その他の研究の多くは、生体内におけるムコ多糖類の生合成、その他代謝に関するものである。

Capps¹⁾らや有山ら²⁾による結果については考察の項で述べるが、われわれは将来資源的にも有望と考えられ

るN-acetyl-D-glucosamine (以下NAGAとする)が家畜の飼料もしくは人の食糧として利用可能かどうかについて知るため、白ネズミによる飼育実験をおこなった。20%カゼイン食を用い70%の糖質のうち40%をコーンスターチとし、残り30%をglucoseもしくはNAGAとする飼料(実験の項のTable 1参照)で実験した。生後3週令の幼白ネズミを用い、飼育期間中の飼料摂取量を測定する他、体重増などについて調べた。糞中NAGA、尿中NAGAなどについても調べた。なお検討を重ねているので、体水分、体窒素などの測定結果とも併せて、次回に報告することにして、今回は、飼料摂取量と体重増の点からの結果のみを報告して考察を加え、今後の研究の参考としたい。

実験方法と結果

実験 I

1. 飼料組織: Casein20%のcontrol dietとNAGAの試験食の飼料組成はTable 1に示すように、casein, corn starch (α), salt mixture, vitamin mixture, choline (HCl塩のアルコール溶液)は田辺アミノ酸基金より購入したもの、corn oilは日本食品工業(株)のコーンサラダオイルを、glucose, ureaは和光純薬工業(株)より購入した1級品、NAGAは阪大理学部、松島祥夫教授より分譲されたものである。全組成をボールミルで充分均等に混合し、飼料投与まで密閉して冷温中で保管した。

2. 実験動物と飼育: JCLのSprague-Dawley (SD)系ラット雄20匹、生後3週令を日本クレア(株)から購入し、室温23±1℃の飼育室においてcontrol dietで2~3日飼育後、体重を測定し、平均体重59gの20匹を2群に群分けし、1匹づつケージに入れ、水は自由に与え、1群はcontrol diet, 他の1群はNAGA30% dietとし、自由食で飼育した。(飼料組成はTable 1のようである。)は、各日に飼料摂取量と体重を測定した。

30%NAGA食投与群では殆んどのラットにおいて下痢

Table 1 Food Composition for Expt. 1

(per100g Diet)

		Control Diet	Acetylglucosamine Diet				
			5 %	10%	15%	20%	30%
Casein	g	20	20	20	20	20	20
Corn starch	g	40	40	40	40	40	40
Glucose	g	30	25	20	15	10	—
N-Acetylglucosamine	g	—	5	10	15	20	30
Corn oil	g	5	5	5	5	5	5
Salt Mix. ²⁾	g	4	4	4	4	4	4
Vit. Mix. ¹⁾	g	1	1	1	1	1	1
Choline	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Chocola-A *	ml	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

* Eizai Co. Ltd

Contained Vit. A 1500IU., Vit. D 150LU.

1) Composition of salt mixture (%), CaCO_3 , 29.29; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.43; KH_2PO_4 , 34.31; NaCl , 25.06; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.98; $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.623; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.156; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.121; ZnCl_2 , 0.02; KI , 0.0005; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0025.

2) Composition of vitamin mixture (%): Thiamine HCl 0.059; Riboflavin, 0.059; Nicotinic acid, 0.294; Ca pantothenate, 0.235; Pyridoxine · HCl, 0.029; Menadione, 0.006; Biotin, 0.001; Folic acid, 0.002; Cyanocobalamin, 0.0002; Inositol, 1.176; Na · L-Ascorbate, 0.588; Lactose 97.551.

便であったので、10匹中7匹を3日目に control diet に切りかえたところ、直ちに普通便となった。そこでその7匹をNAGA10%に切りかえたところ、再び軽い下痢をおこしたので、7匹中の3匹はそのまま10%NAGA食を26日間つづけた(E 2群)。4匹をcontrol diet に切りかえた。そこで直ちに普通便にもどったので4日後再び5%食に切りかえ20日間つづけた。(E 1群)。一方30%食投与を継続していた3匹については6日目に control diet に(30%食をそのままつづければ、馴れにより下痢が止まる可能性を期待したが、依然として下痢をつづけたので)切りかえたところ、直ちに軟便から普通便に変わったので6日の後、5%食に切りかえた(E 3群)。

以上のように30%NAGA食投与では、著しい下痢をおこし、体重の低下もしくは増加が少く、実験をつづけられなかったが、5%食では全く下痢は見られず、図1に示すように体重もcontrol群に平行して増量した。一方10%食においては、時々軽い下痢をおこす程度で、体重はほぼ同程度に増量した。飼育32日目にはcontrol群の平均体重289g、試験群(E 1, E 2, E 3群)の平均は238gであったが、試験群では初期30%NAGA食投与により体重差があらわれたことも影響しているので、下痢をおこさない5%食もしくは、時々軽い下痢を見る程度の10

%食ならばNAGAも、glucoseとはほぼ同程度にエネルギー源として利用される可能性があると考えられる結果であった。

またNAGA食の吸収速度、下痢発生の程度には個体差や、馴れ、あるいはラットの年齢による大きさなどにも相異があることが観察されたので、32日間飼育の時点で、NAGA 5%群(E 1とE 3群)の7匹をNAGA10%群に、NAGA10%群(E 2群)の3匹をNAGA20%に切えた。E 1, E 3群(NAGA10%食)では下痢も少く、体重も順調に増加し、E 2群(NAGA20%食)では3匹中1匹が下痢し、そのため、平均体重の増は10%食群より劣ることも図1の32日以降に示す通りである。

以上の結果からcasein20%食において、glucose30%のうち5~10%分をNAGAでおきかえうる可能性が観察された。

実験Ⅱ

実験Ⅰにおいては、実験経過中にcontrol diet にもどしている。従って継続して、何%位のNAGA食で養えるかを知るための予備実験と本実験を次のようにおこなった。

1. 予備実験: 飼料組成、ラットは実験Ⅰと同じが、只2匹について図2に示すように、NAGA 5%から30%

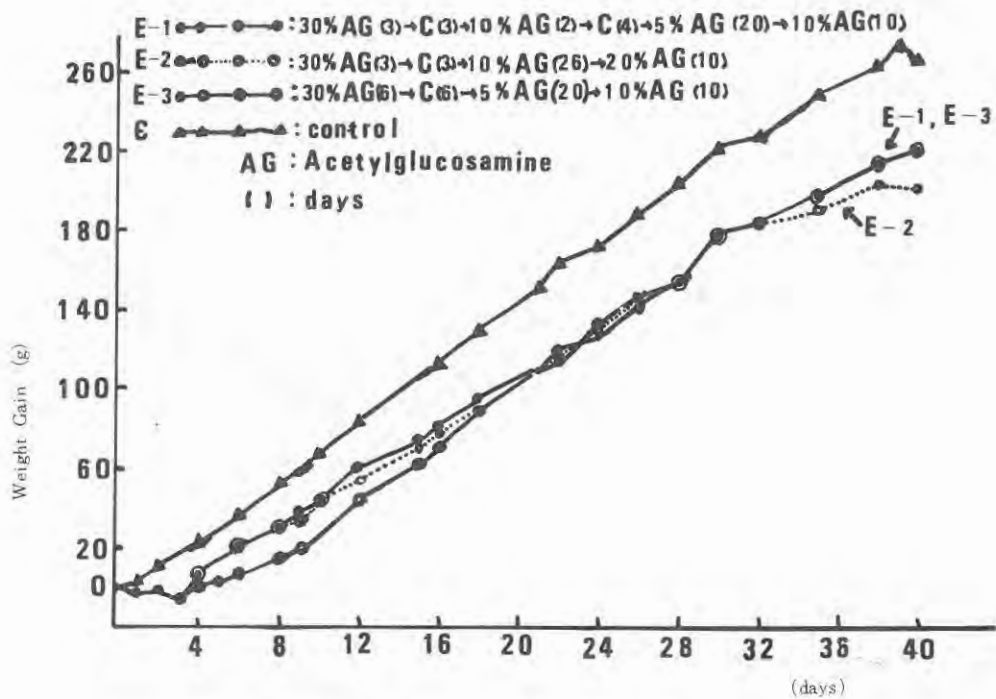


図-1 Changes in Body Weight of Rat Fed Acetylglucosamine Diet.

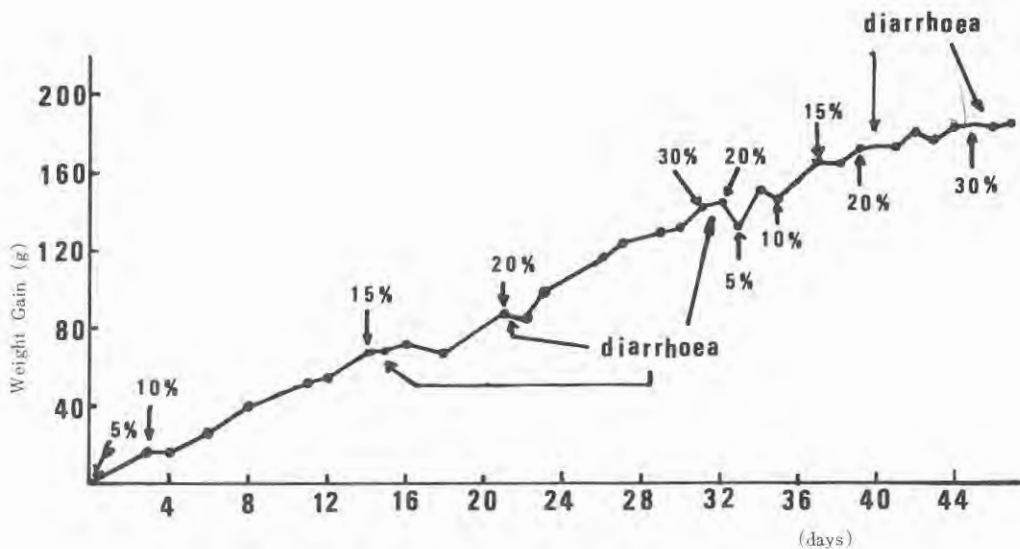


図-2 Changes in Body Weight of Rat Fed Acetylglucosamine Diet. (5-30%)

まで順次増量して、経過を見た。15%食で軽い下痢が時々きながらも一応ゆるやかな体重増をしめし、20%食で幾分強い下痢とは云え、尚ゆるやかに体重は増量したが30%食ではげしい水溶性便となることが観察された。含量を徐々に増せば、幾分馴れる様に見られたので、本実

験では、次にしめすように、21匹についてNAGA 5%より順次上昇させて馴らした上で群分けして本実験をおこなった。

2. 本実験：実験動物は実験Iと同じくJCLのSD系ラット雄21匹、生後3週令を日本クレアから購入し、NAGA

5%4日間(下痢なし)次に10%食3日間(約1/2のラットが軽い下痢)つづいて7%食に減じて3日間(1~2匹のみ軽い下痢)再び10%食に切かえ(1/2程軽い下痢)次いで再び7%食として3日間(殆んど下痢なし)此時点でラットの平均体重132gとなったので、これを、Table 2に示す3群の飼料群に分けて、(NAGA 7%群, glucose 7%群(総量では30%) cellulose 7%群)13日間飼育実験をおこなった。

各群13日間の体重の変化は図-3に示すようで、体重増量には各群に有意の差をしめさなかった。また13日間の飼料摂取量と、体重増量、食物効率(Food efficiency)はTable 3に示すようで、NAGA群はglucose群、cellulose群と大差をしめさなかった。しかしながらcellulose 7%食では glucose食やNAGA食群に比し20%前後多量の飼料を摂取していることが、体重増に役立って

Table 2 Food Composition for Expt. 2

	7%N-Acetylglucosamin Diet	7%Glucose Diet	7%Cellulose Diet
Casein	20	20	20
Potato starch	40	40	40
Glucose	23	23+7(30)	23
Cellulose	—	—	7
N-Acetylglucosamine	7	—	—
Corn oil	5	5	5
Salt Mix. ¹⁾	4	4	4
Vit. Mix. ¹⁾	1	1	1
Choline	0.1ml	0.1	0.1
Chocola-A*	0.05ml	0.05	0.05
Urea	—	0.96**	0.96**

1) Compositions are same as those of Expt. 1

* Eizai Co. Ltd.
contained Vit. A 1500I.U.
Vit. D 150I.U.

** Isonitrogenous with acetylglucosamine Diet

Table 3 Result of Feeding Test of N-D-glucosamine Diet Compared with Glucose or Cellulose Diet.

(13 days)

Diet	Food intake g	Body weight gain	Food efficiency
7% NAGA	226.5±16.4 (7)	79.4±8.3	0.351±0.038
7% glucose	234.9±15.6 (7)	81.1±12.3	0.345±0.047
7% Cellulose	262.5±37.8 (7)	88.6±17.8	0.337±0.044

() Number of rats ; ± Deviation
20% Casein diet (ad libitum feeding)

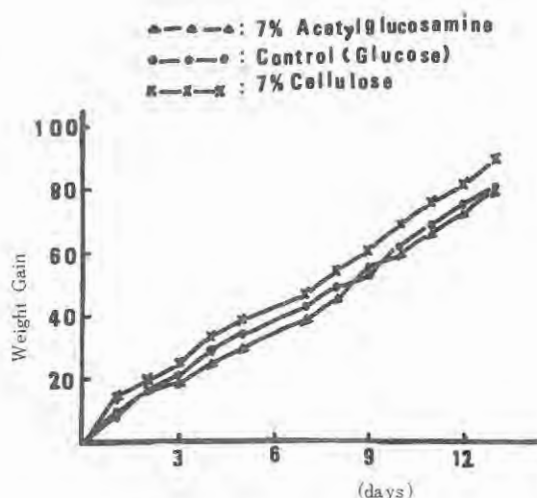


図-3 Changes in Body Weight of Rat Fed 7% Acetylglucosamine, Glucose, or Cellulose Diet.

り、また個体差が大きかった。一方glucose食群とNAGA群では、飼料摂取量、体重増量、食物効率、共に大差のないことが観察された。

然し以上の結果は全体重についての結果であるので、ラットの全カーカスの水分、体窒素などについても検討後、追ってその結果をも併せてNAGA利用に関する考察を加えない。なお下痢の主な原因は吸収困難によるものと考えられるが、糞や尿中NAGA値についても更に検討中である。

考 察

緒言で述べたように糖源の1つとしてglucosamineやacetylglucosamineの栄養価や、経口投与時の代謝に関する研究は少く、1929年有山ら²⁾が馬肉たんぱく質の27%、バター70%、塩混合3%、酵母0.2%の飼料を40~

45 gの雄のラットに1日4.2 g投与した際に29種の各供試炭水化物の1つとしてglucosamine HCl塩1.25 g、(飼料当り約30%に相当する)を25日間経口投与した。その結果著しい下痢のため試験を中止し、次いでNaHCO₃で中和して投与したが、同じく25日で下痢のため斃死したと報じている。

一方1966年Capps¹⁾らはD-[1-¹⁴C]-glucosamine, N-acetyl-D-[1-¹⁴C]-glucosamineやN-[1-¹⁴C]-acetyl-D-glucosamineについて、D-[1-¹⁴C]glucoseとの比較研究において、4週令約100 gの雄Holtzman strainのラットを用い水のみで、24時間絶食後、これら放射性の糖を胃管(stomach tube)を似って一定量投与し、次の結果を得ている。①glucosamineは腸内細菌によって破壊されその吸収効率は1時間、体重100 g当り0.104±0.017mmoleであり、glucoseのそれより著しく低い(glucoseでは0.831mmole/100 g体重/1時間のabsorption coefficient)。②上の3種の放射性glucosamineもしくはacetylglucosamineから吸収された放射能のかなりの部分が、3時間以内に、肝臓や小腸組織のhexoseやamino acid画分に証明され、hexosamine, hexose, amino acidへの放射能の分布比はほぼ同じであった。③尿中に検出された放射性monosaccharideの大部分は投与した放射性glucosamineもしくはacetylglucosamineであった。④投与3時間以内に呼気に排出された放射性CO₂は吸収されたD-[1-¹⁴C]glucosamineの放射能の約18%、N-acetyl-D-[1-¹⁴C]glucosamineの9%、N-[1-¹⁴C]-acetyl-D-glucosamineの30%であったので、この結果からN-acetylglucosamineのかなりの量が脱acetyl化されることが推察される。

以上の結果から見てもN-acetyl-D-glucosamineはglucoseに較べて吸収効率は悪い様で、吾々も糞中に排泄される量を測定したが、意外に低値であり対照のglucose群より幾分高い程度で大差なかった。そこで測定法や、安定性について検討中であるが、やはり腸内細菌によって破壊されている可能性もあるものと考えている。また尿中のhexosamineを測定したが、これもglucose群のそれより極僅かに高い程度で、その量も僅かであったので、現在検討を加えている。しかしおそらく吸収されたacetylglucosamineは体内で大部分、分解やムコ多糖類の合成にまわされ、代謝されたものによるものであるかもしれない。またLeloir³⁾は動物組織によってgluco-

samine-6-phosphateからfructose-6-phosphateが生成されると報じ、Imanaga⁴⁾は*Aerobacter cloacae*の菌体抽出液からの粗酵素標品がglucosamineを分解し、それによって生ずるNH₃を証明し、またfructose-6-phosphateをBa塩として分離し、本粗酵素標品がglucosamine→glucosamine-6-phosphate→fructose-6-phosphate+NH₃の反応を促進することを報じ、また脱アミノ反応の機構を提案している。

またTable 3の食物効率比からみても、吸収され、代謝されると考えられる。しかしNAGAの吸収率や、腸内での分解の程度、尿中に排泄される量、体重に影響を与えている成分などに関する或程度のデーターを得たうえ、次報としあらためて考察を加えたい。

要 旨

Chitinを塩酸水解して得たglucosamine HClをN-acetyl化して得たN-acetyl-D-glucosamineを、20% casein食において、5~30%になるように配合した飼料でSprague-Dawley系のラット雄を用いて自由食による飼育実験をおこなった。その結果幾分個体差はあるが、ほぼ10~15%のacetylglucosamine食で軽い下痢をともしながらも生育するが20~30%食では、かなりはげしい下痢をしめし、飼育困難であった。

幼ラットを前以って5~10%acetylglucosamine食で13日間馴らした後、7%のacetylglucosamine, glucoseあるいはcellulose食の3群に分けて飼育実験をおこなった結果、体重増と飼料摂取量から求めた食物効率比には大差のないことを認めた。

上の実験結果に考察を加えた。

本研究をおこなうに当り、御声援と御後援ならびに、N-acetyl-D-glucosamineの御提供を給わった、大阪大学理学部、松島祥夫教授に対しこゝに感謝の意を表する。

文 献

- 1) Capps, J. C., Shetler, M. R. and Bradford, R. H.: Biochim. Biophys. Acta, **127**, 194 (1966)
- 2) 有山恒, 高橋勝夫: 農化, **5**, 674 (1929)
- 3) Leloir, L. F., and Cardini, C. E., Biochim. Biophys. Acta., **20**, 33 (1956).
- 4) Imanaga, Y.: J. Biochem., **44**, 69 (1957).

Summary

Feeding tests of growing rats (ad libitum) with the 20% casein diet supplied 5-30% N-acetyl-D-glucosamine (NAGA) out of 70% carbohydrate indicated that the diet supplied 10—15% NAGA caused diarrhea, but the growth was not ceased. However, feeding of the diet with 20—30% NAGA was almost impossible to continue the test, because of severe diarrhea.

After growing rats were trained with the diets of 5-10% NAGA, the rats were divided into three groups, 7% NAGA-, 7% glucose-, or 7% cellulose diet group, and fed ad libitum for 13-day. Food efficiency calculated from the food intake and the body weight gain during 13-day of the 7% acetylglucosamine-, 7% glucose-, and 7% cellulose-diet group was respectively 0.351 ± 0.038 , 0.345 ± 0.047 , and 0.337 ± 0.044 .

Discussion was made with the results of the experiment, referring to the other few papers.